

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号
C 0 7 D 498/18		8415-4C
A 6 1 K 31/40	A A M	9454-4C
31/435	A B R	9454-4C
31/55	A B S	9454-4C

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願平6-515010  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)12月24日  
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)6月26日  
 (86) 国際出願番号 PCT/J P 93/01886  
 (87) 国際公開番号 WO 94/14443  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)7月7日  
 (31) 優先権主張番号 9227055.2  
 (32) 優先日 1992年12月29日  
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, KR, US

(71) 出願人 藤沢薬品工業株式会社  
 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号  
 (72) 発明者 ケリー、ジョン エス.  
 イギリス国、イーエイチ8 9 ジェイゼツ  
 ド、エディンバラ、ジョージ スクウェア  
 1、ユニヴァーシティ オブ エディン  
 バラ内  
 (72) 発明者 ブッチャー、スティーブン ピー.  
 イギリス国、イーエイチ8 9 ジェイゼツ  
 ド、エディンバラ、ジョージ スクウェア  
 1、ユニヴァーシティ オブ エディン  
 バラ内  
 (74) 代理人 弁理士 高島 一

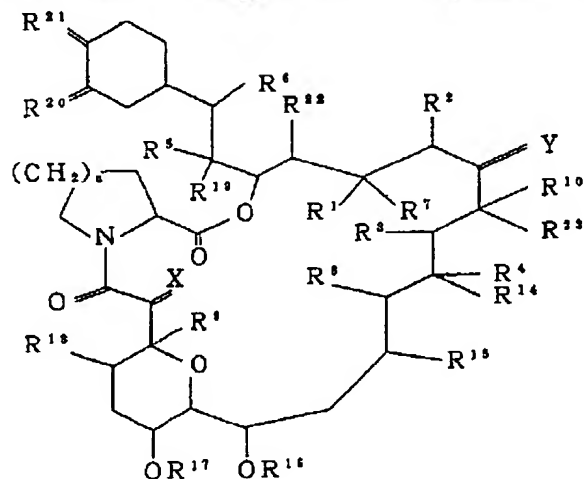
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳虚血治療のためのマクロライドの用途

## (57) 【要約】

本発明は、化学式 (I) で表されるマクロライド化合物の、脳虚血性疾患の予防または治療のための新規な用途に関する、ここで各々の記号は明細書中で定義している通りである。本発明は、脳虚血性疾患、言い換えると、脳梗塞のような虚血により引き起こされる脳障害の予防

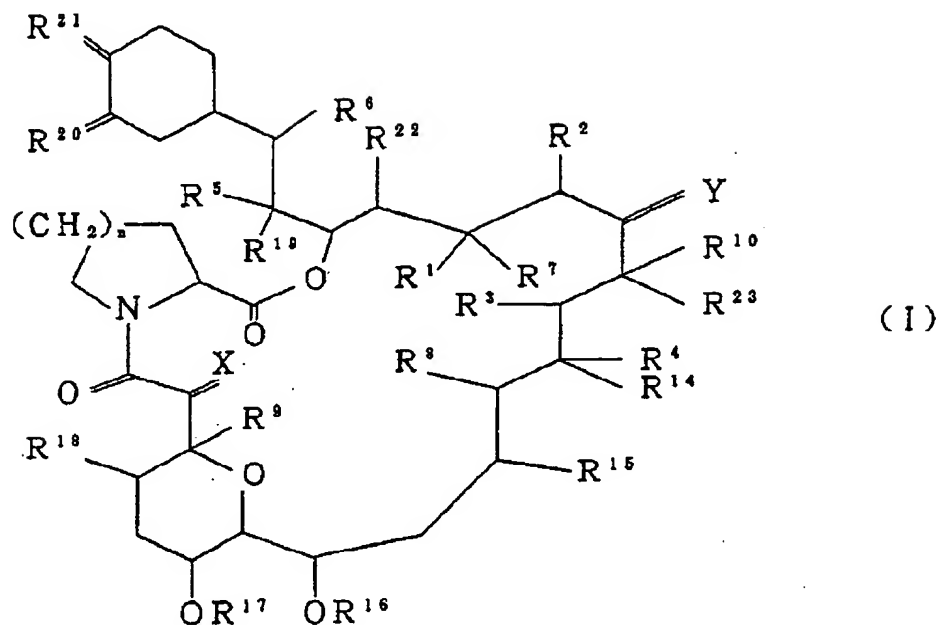
または治療のための有用な医薬を提供するものである。つまり、以下に述べるような疾患、或いは損傷が起こった際に有用である。即ち、頭部損傷、くも膜下出血或いは脳内出血のような脳での出血、脳血栓症、脳塞栓症、心停止、脳卒中、一過性脳虚血発作 (TIA)、高血圧性脳疾患などである。



(I)

## 【特許請求の範囲】

## 1. 式 (I) :



(式中、それぞれ隣位の置換基対  $[R^1$  および  $R^2]$ 、 $[R^3$  および  $R^4]$ 、 $[R^5$  および  $R^6]$  は、独立して、

a) 隣位の2つの水素原子を表すか、或いは

b) それらが結合する隣位の炭素原子の間で、第二の結合を形成し、

上記の定義に加えて、 $R^2$  はアルキル基を表してもよく、

$R^7$  は、H、OH、保護された水酸基、またはO-アルキルを示すか、或いは  $R^1$  と共に  $=O$  を表してもよく、

$R^8$  および  $R^9$  は、独立して、H、またはOHを表し、

$R^{10}$  は、H、アルキル、1つ又はそれ以上の水酸基で置換されたアルキル、アルケニル、1つ又はそれ以上の水酸基で置換されたアルケニル、または  $=O$  で置換されたアルキルを表し、

Xは、O、(H, OH)、(H, H)、または  $-CH_2O-$  を表し、

Yは、O、(H, OH)、(H, H)、 $N-NR^{11}R^{12}$ 、または  $N-OR^{13}$  を表し、

$R^{11}$  と  $R^{12}$  は、独立して、H、アルキル、アリール、またはトシルを表し、

$R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{22}$  および  $R^{23}$  は、独立して、H、またはアルキルを表し、

$R^{20}$  と  $R^{21}$  は、独立して、Oを表すか、或いは、独立して ( $R^{20}a$ , H) および ( $R^{21}a$ , H) をそれぞれ示してもよく、 $R^{20}a$  および  $R^{21}a$  は、独立して、OH、O-アルキル、または  $OCH_2OCH_2CH_2OCH_3$  を表すか、或いは  $R^{21}a$  は保護された水酸基であり、

加えて、 $R^{20}a$  および  $R^{21}a$  は一緒になって、エポキシ環中の酸素原子を表してもよく、

n は 1、2、または 3 であり、

上記の定義に加えて、Y、 $R^{10}$  および  $R^{23}$  は、それらが結合している炭素原子と共に、5 又は 6 員の N、S または O を含む複素環を表してもよく、この環は飽和でも不飽和でもよく、アルキル、水酸基、1 つ又はそれ以上の水酸基で置換されたアルキル、O-アルキル、ベンジル、および  $-CH_2Se(C_6H_5)$  より選ばれる 1 つ又はそれ以上の基により置換されていてもよい。) )

で表されるマクロライド化合物、またはその医薬上許容される塩の、脳虚血性疾患の予防または治療のための用途。

2. 請求の範囲第 1 項記載のマクロライド化合物 (I) またはその医薬上許容される塩の、脳虚血性疾患の予防または治療薬としての用途。

3. 請求の範囲第 1 項記載のマクロライド化合物 (I) またはその医薬上許容される塩を含有する脳虚血性疾患の予防または治療薬。

4. 請求の範囲第 1 項記載のマクロライド化合物 (I) またはその医薬上許容される塩を哺乳動物に投与することからなる、脳虚血性疾患の予防または治療方法。

5. 請求の範囲第 1 項記載のマクロライド化合物 (I) またはその医薬上許容される塩の、脳虚血性疾患の予防または治療薬製造のための用途。

6. 請求の範囲第 1 項記載のマクロライド化合物 (I) またはその医薬上許容される塩と担体または賦形剤との混合物を含有する脳虚血性疾患の予防または治療のための医薬組成物。

7. マクロライド化合物 (I)、またはその医薬上許容される塩を担体または賦

形剤と混合することを特徴とする、請求の範囲第6項記載の医薬組成物の調製方法。

8. 請求の範囲第1項から第7項のうちのいずれかで使用されるマクロライド化合物が、17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンである。

9. 請求の範囲第1項から第8項のうちのいずれかの脳虚血性疾患が、脳梗塞である。

## 【発明の詳細な説明】

## 脳虚血治療のためのマクロライドの用途

## 技術分野

本発明は、マクロライド化合物の新規な用途に関する。

更に詳しくは、本発明は脳虚血性疾患の予防または治療のための、マクロライド化合物の新規な用途に関する。

従って、本発明は、脳虚血性疾患の予防または治療のためのマクロライド化合物の新規な用途を提供するものである。

## 背景技術

本発明で使用されるマクロライド化合物は公知であり、例えばヨーロッパ特許出願公開第0184162号明細書や国際出願公開WO89/05304号明細書に開示されている。

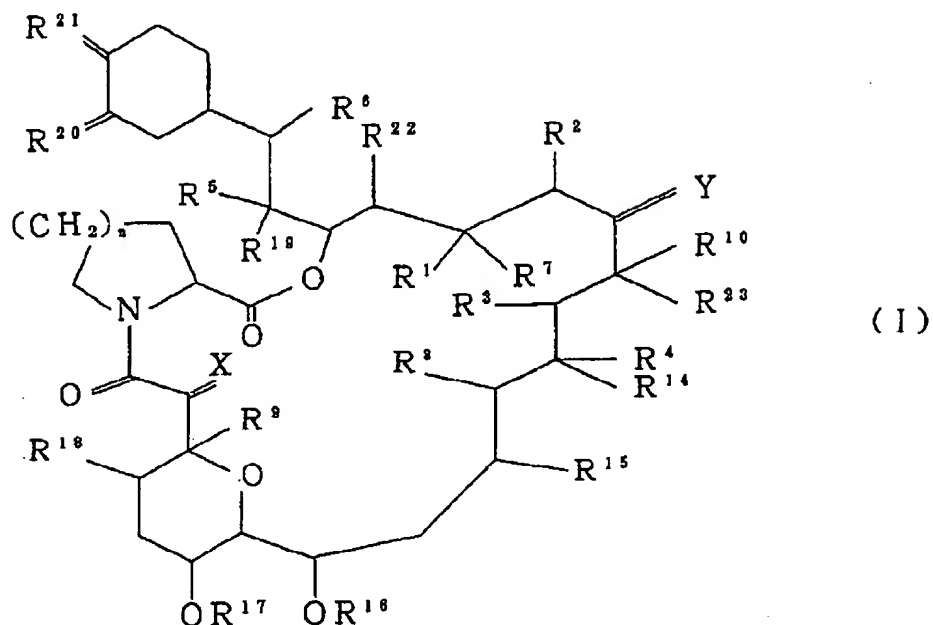
これら公知のマクロライド化合物は、ストレプトミセス ツクバエンシス (Streptomyces tsukubaensis) No. 9993 (FERM BP-927)、或いはストレプトミセス ハイグロスコピカス サブスペシース ヤクシマエンシス (Streptomyces hygroscopicus subsp. yakushimaensis) No. 7238 (FERM BP-928) のようなストレプトミセス (Streptomyces) 属に属する微生物から単離されたFR-900506、FR-900520、FR-900523、およびFR-900525等の発酵生成物や、これらの発酵生成物より調製される関連化合物を含む。

これらのマクロライド化合物は、就中、移植に対する拒絶反応、自己免疫疾患、および、例えば、アスペルギルス属 (Aspergillus)、フザリウム属 (Fusarium)、白癬菌属 (Trichophyton) 等によって引き起こされる感染症の治療に用いられるとされてきた。

## 発明の開示

本発明の発明者等は、驚くべきことに以下に述べるようなマクロライド化合物が、神経防御作用を有し、脳虚血性疾患、特に脳梗塞、の予防または治療に有用であることを見出した。

本発明で使用するマクロライド化合物は、次のような一般式 (I) により表される。



(式中、それぞれ隣位の置換基対  $[R^1$  および  $R^2]$ 、 $[R^3$  および  $R^4]$ 、 $[R^5$  および  $R^6]$  は、独立して

a) 隣位の2つの水素原子を表すか、或いは

b) それらが結合する隣位の炭素原子の間で、第二の結合を形成し、

上記の定義に加えて、 $R^2$  はアルキル基を表してもよく、

$R^7$  は、H、OH、保護された水酸基、またはO-アルキルを示すか、或いは  $R^1$  と共に  $=O$  を表してもよく、

$R^8$  および  $R^9$  は、独立して、H、またはOHを表し、

$R^{10}$  は、H、アルキル、1つ又はそれ以上の水酸基で置換されたアルキル、アルケニル、1つ又はそれ以上の水酸基で置換されたアルケニル、または  $=O$  で置換されたアルキルを表し、

Xは、O、(H, OH)、(H, H)、または  $-CH_2O-$  を表し、

Yは、O、(H, OH)、(H, H)、 $N-NR^{11}R^{12}$ 、または  $N-OR^{13}$  を表し、

$R^{11}$  と  $R^{12}$  は、独立して、H、アルキル、アリール、またはトシルを表し、

$R^{13}$ 、 $R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{22}$  および  $R^{23}$  は、独立して、H、またはアルキルを表し、

$R^{20}$  と  $R^{21}$  は、独立して、Oを表すか、或いは、独立して ( $R^{20}a$ , H) および ( $R^{21}a$ , H) をそれぞれ示してもよく、 $R^{20}a$  および  $R^{21}a$  は、独立して、OH、O-アルキル、または  $OCH_2OCH_2CH_2OCH_3$  を表すか、或いは  $R^{21}a$  は保護された水酸基であり、

加えて、 $R^{20}a$  および  $R^{21}a$  は一緒になって、エポキシ環中の酸素原子を表してもよく、

$n$  は1、2、または3であり、

上記の定義に加えて、Y、 $R^{10}$  および  $R^{23}$  は、それらが結合している炭素原子と共に、5又は6員のN、SまたはOを含む複素環を表してもよく、この環は飽和でも不飽和でもよく、アルキル、水酸基、1つ又はそれ以上の水酸基で置換されたアルキル、O-アルキル、ベンジル、および  $-CH_2Se(C_6H_5)$  より選ばれる1つ又はそれ以上の基により置換されていてもよい。) )

化合物 (I) の定義の具体例、および本発明の好ましい実施態様を以下に詳述する。

本明細書で、使われる「低級」という用語は、ことわりのない限り、炭素数1～6のものであることを意味する。

適切な「アルキル」は、直鎖又は分岐状の飽和脂肪族炭化水素の残基を意味し、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル等のような低級アルキルを含む。

適切な「アルケニル」は、一つの二重結合を有する直鎖又は分岐状の不飽和脂肪族炭化水素の残基を意味し、ビニル、プロペニル (例えば、アリル)、ブテニル、メチルプロペニル、ペンテニル、ヘキセニル等のような低級アルケニルを含む。

適切な「アリール」は、フェニル、トリル、キシリル、クメニル、メシチル、ナフチル等が含まれる。

「保護された水酸基」における保護基の適切な例は、以下のようなものが挙げ

られる；

低級アルキルチオメチル基（例えば、メチルチオメチル、エチルチオメチル、プロピルチオメチル、イソプロピルチオメチル、ブチルチオメチル、イソブチルチオメチル、ヘキシルチオメチル等）、より好ましくは $C_1-C_4$ アルキルチオメチル基、最も好ましくはメチルチオメチルのような、1-（低級アルキルチオ）（低級）アルキル基；トリ（低級）アルキルシリル基（例えば、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリブチルシリル、第三級ブチルジメチルシリル、トリ第三級ブチルシリル等）、低級アルキルジアリールシリル基（例えば、メチルジフェニルシリル、エチルジフェニルシリル、プロピルジフェニルシリル、第三級ブチルジフェニルシリル等）、より好ましくはトリ（ $C_1-C_4$ ）アルキルシリルおよび $C_1-C_4$ アルキルジフェニルシリル基、最も好ましくは、第三級ブチルジメチルシリルおよび第三級ブチルジフェニルシリルのような、トリ置換シリル基；およびカルボン酸、スルホン酸、またはカルバミン酸から誘導される、脂肪族アシル基、芳香族アシル基、および芳香族基で置換された脂肪族アシル基のようなアシル基である。

脂肪族アシル基には、カルボキシのような適切な置換基を、任意に1つ又はそれ以上有していてもよい低級アルカノイル基（例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ピバロイル、ヘキサノイル、カルボキシアセチル、カルボキシプロピオニル、カルボキシブチリル、カルボキシヘキサノイル等）、低級アルキルのような適切な置換基を、任意に1つ又はそれ以上有していてもよいシクロ（低級）アルコキシ（低級）アルカノイル基（例えば、シクロプロピルオキシアセチル、シクロブチルオキシプロピオニル、シクロヘプチルオキシブチリル、メンチルオキシアセチル、メンチルオキシプロピオニル、メンチルオキシブチリル、メンチルオキシペンタノイル、メンチルオキシヘキサノイル等）、カンファースルホニル、カルボキシまたは保護されたカルボキシのような適切な置換基を、1つ又はそれ以上有する低級アルキルカルバモイル基、例えばカルボキシ（低級）アルキルカルバモイル基（例えば、カルボキシメチルカルバモイル、カルボキシエチルカルバモイル、カルボキ



シプロピルカルバモイル、カルボキシブチルカルバモイル、カルボキシペンチルカルバモイル、カルボキシヘキシルカルバモイル等)、トリ(低級)アルキルシリル(低級)アルコキシカルボニル(低級)アルキルカルバモイル基のような保護されたカルボキシ(低級)アルキルカルバモイル基、(例えば、トリメチルシリルメトキシカルボニルエチルカルバモイル、トリメチルシリルエトキシカルボニルプロピルカルバモイル、トリエチルシリルエトキシカルボニルプロピルカルバモイル、第三級ブチルジメチルシリルエトキシカルボニルプロピルカルバモイル、トリメチルシリルプロポキシカルボニルブチルカルバモイル等)等が含まれる。

芳香族アシル基には、ニトロのような適切な置換基を、任意に1つ又はそれ以上有していてもよいアロイル基(例えば、ベンゾイル、トルオイル、キシロイル、ナフトイル、ニトロベンゾイル、ジニトロベンゾイル、ニトロナフトイル等)、ハロゲンのような適切な置換基を、任意に1つ又はそれ以上有していてもよいアレーンスルホニル基(例えば、ベンゼンスルホニル、トルエンスルホニル、キシレンスルホニル、ナフタレンスルホニル、フルオロベンゼンスルホニル、クロロベンゼンスルホニル、ブロモベンゼンスルホニル、ヨードベンゼンスルホニル等)等が含まれる。

芳香族基で置換された脂肪族アシル基には、低級アルコキシおよびトリハロ(低級)アルキルのような適切な置換基を、任意に1つ又はそれ以上有していてもよいアル(低級)アルカノイル基(例えば、フェニルアセチル、フェニルプロピオニル、フェニルブチリル、2-トリフルオロメチル-2-メトキシ-2-フェニルアセチル、2-エトキシ-2-トリフルオロメチル-2-フェニルアセチル、2-トリフルオロメチル-2-プロポキシ-2-フェニルアセチル等)等が含まれる。

上述のアシル基の中で、より好ましいアシル基は、任意にカルボキシで置換されていてもよい $C_1-C_4$ アルカノイル基、シクロアルキル部位に2つの( $C_1-C_4$ )アルキル基を有するシクロ( $C_5-C_6$ )アルキルオキシ( $C_1-C_4$ )アルカノイル基、カンファースルホニル、カルボキシ( $C_1-C_4$ )アルキルカ

ルバモイル基、トリ ( $C_1-C_4$ ) アルキルシリル ( $C_1-C_4$ ) アルコキシカルボニル ( $C_1-C_4$ ) アルキルカルバモイル基、1つ又は2つのニトロ基を有していてもよいベンゾイル、ハロゲン置換ベンゼンスルホニル基、 $C_1-C_4$ アルコキシおよびトリハロ ( $C_1-C_4$ ) アルキル基を有するフェニル ( $C_1-C_4$ ) アルカノイル基である。これらの基のうち、最も好ましいのは、アセチル、カルボキシプロピオニル、メントルオキシアセチル、カンファースルホニル、ベンゾイル、ニトロベンゾイル、ジニトロベンゾイル、ヨードベンゼンスルホニル、および2-トリフルオロメチル-2-メトキシ-2-フェニルアセチルである。

適切な「5又は6員のN、SまたはOを含む複素環」には、ピロリル、テトラヒドロフリル等が含まれる。

記号 $R^1 \sim R^{10}$ 、 $R^{14} \sim R^{23}$ 、X、Y、およびnの好ましい具体例は以下の通りである。

$R^1$ および $R^2$ は、それぞれ水素であるか、或いは結合して第二の結合を形成し、

$R^3$ および $R^4$ は、結合して第二の結合を形成し、

$R^5$ および $R^6$ は、結合して第二の結合を形成し、

$R^7$ は、水素、水酸基、メトキシのようなO-低級アルキル、または保護された水酸基であり、

$R^8$ は、水素、または水酸基であり、

$R^9$ は、水酸基であり、

$R^{10}$ は、メチル、エチル、プロピル、アリル、または2-オキソプロピルであり、

$R^{14}$ 、 $R^{15}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 、および $R^{22}$ は、それぞれメチルであり、

$R^{20}$ は、オキソ、または( $R^{20}a$ , H)であり、ここで、 $R^{20}a$ は水酸基、またはメトキシであり、

$R^{21}$ は、( $R^{21}a$ , H)であり、ここで、 $R^{21}$ は水酸基、または保護された水酸基であり、

$R^{23}$ は、水素であり、

Xは、オキソ、(H, OH)、または(H, H)であり、

Yは、オキソであり、

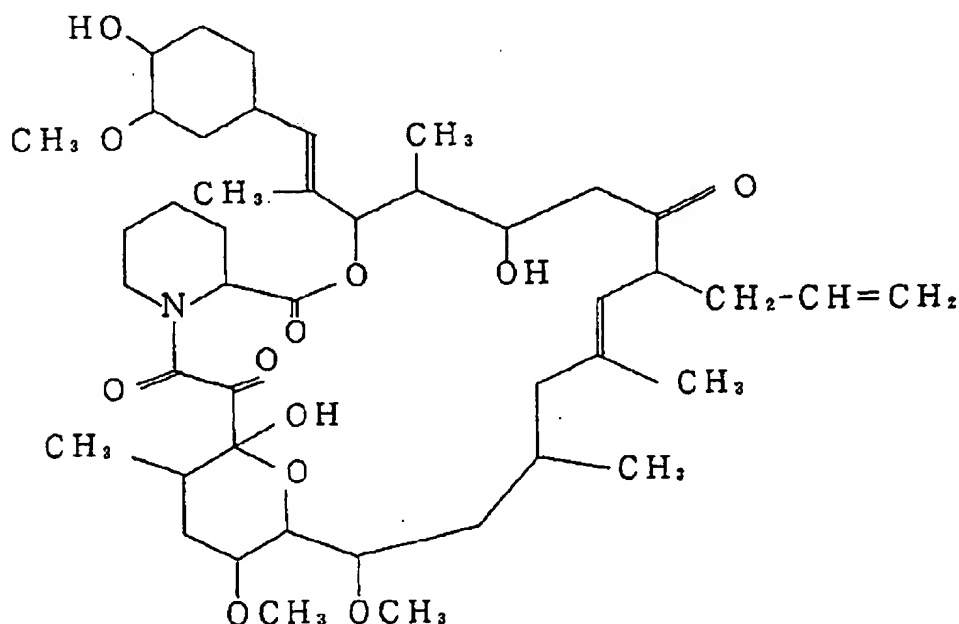
nは、1または2である。

化合物(I)の医薬上許容される塩は、無毒性の塩であり、アルカリ金属塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等)、アルカリ土類金属塩(例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩等)、アンモニウム塩、およびアミン塩(例えば、トリエチルアミン塩、N-ベンジル-N-メチルアミン塩等)等のような無機、または有機塩基との対応する塩である。

マクロライド化合物(I)に関して、1つ又はそれ以上の配座異性体、或いは不斉炭素または二重結合による光学および幾何異性体のような、1対又はそれ以上の立体異性体が存在する。このような配座異性体および異性体もまた、本発明の範囲に含まれる。

特に最も興味のある化合物は、以下の式で表されるFR-900506である。

。



(以下、FK506と記述する。)

化合物名：17-アリル-1, 14-ジヒドロキシー-12-[2-(4-ヒドロキシー-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル]-23, 25-ジ

メトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン。

他の好ましい化合物を以下に挙げる。

1, 14-ジヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 17, 21, 27-ペンタメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン、

12-[2-(4-アセトキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル]-17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン、

17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-12-[2-[4-(3, 5-ジニトロベンゾイルオキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルビニル]-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン、

17-アリル-12-[2-[4-[(-)2-トリフルオロメチル-2-メトキシ-2-フェニルアセトキシ]-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルビニル]-1, 14-ジヒドロキシ-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0<sup>4,9</sup>]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン、

17-エチル-1, 14-ジヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル]-23, 25-ジメトキシ-

13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリ

シクロ〔22.3.1.0<sup>4,9</sup>〕オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオン、および

17-エチル-1,14,20-トリヒドロキシ-12-〔2-(3,4-ジヒドロキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル〕-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ〔22.3.1.0<sup>4,9</sup>〕オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオンである。

本発明のマクロライド化合物(I)は、純粋、或いは純粋でない形態で、それ自体で、或いはその混合物として、好ましくは医薬の賦形剤または担体との混合物として投与することができる。

本発明の医薬組成物は、例えば固形、半固形、または液状の医薬製剤の形態で使用されることができ、この医薬製剤は、外用(局所)、経腸、経口、静脈内、筋肉内、または非経口的使用に適する有機、或いは無機の担体または賦形剤との混合物中に、本発明のマクロライド化合物を有効成分として含有するものである。有効成分は、軟膏、クリーム、硬膏剤、錠剤、ペレット、カプセル、坐剤、液剤(例えば、食塩水)、乳剤、懸濁剤(例えば、オリーブ油)、およびその他の使用に適する剤形とするための、通常は無毒性で医薬上許容される担体と共に、製剤化することができる。使用することのできる担体は、水、ろう、グルコース、ラクトース、アカシアゴム、ゼラチン、マンニトール、澱粉ペースト、トリケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン、パラフィン、コロイド状シリカ、馬鈴薯澱粉、尿素、およびその他の製剤を調製する際に適する固形、半固形、または液状の担体があり、さらに、安定化剤、増粘剤、着色料、および香料を使用してもよい。有効成分となる化合物は、疾病の進行、または病状に対し、所望の効果をを得るのに十分な有効量を医薬組成物に含有させる。

本発明により治療を施すことができる哺乳動物には、ウシ、ウマ等のような家畜、イヌ、ネコ、ラット等のような屋内にいる動物、およびヒトが含まれ、好ましくは、ヒトである。

この組成物をヒトに適用するためには、経口投与、非経口投与、経腸投与、静

脈内投与、または筋肉内投与により適用することが好ましい。

マクロライド化合物の治療上有効な用量は、治療すべき各患者の個々の年齢および状態により異なるが、全身投与の場合、1日の用量は、約0.0001-1000mg、好ましくは0.001-500mg、さらに好ましくは0.01-100mgの有効成分が、一般的に疾病治療のために投与され、1回の平均用量約0.001-0.01mg、0.2-0.5mg、1mg、5mg、10mg、50mg、100mg、250mg、および500mgが、一般的に投与される。ヒトに長期に渡り投与する場合、約0.05-50mg/kg/日の範囲内で、好ましくは0.1-10mg/kg/日、さらに好ましくは0.1-0.3mg/kg/日である。

さらに、ヨーロッパ特許出願公開第353678号明細書、特願平2-74330号明細書、国際出願PCT/GB90/01262号明細書、ヨーロッパ特許出願公開第413532号明細書、国際出願PCT/JP91/00314号明細書、英国特許出願第9012963.6、9014136.7、9014681.2、9014880.0、9014881.8、9015098.8、9016115.9、および9016693.5号の各明細書、ヨーロッパ特許出願公開第323865、349061、358508、364031、364032、378317、378320、378321、388153、396399、396400、399579、403242、428365、356399号の各明細書、英国特許出願公開第2225576号明細書、ヨーロッパ特許出願公開第402931、427680、445975、455427、463690、464895、466365、478235、480623、509753、515071、520554、526934、530888、532089、および532088号の各明細書、国際出願公開WO92/06992、WO92/20688、WO93/04679、WO93/05059、およびWO93/04680号の各明細書、米国特許第5149701号明細書、ドイツ特許出願公開第4021404、4028664、4028665、4028666、

4028667、4028675、4028676、4028677、4028678、および4039587号の各明細書等の特許出願に開示されている化合物もまた、本明細書に示されている疾患に対し、有効であると考えられている。

本発明の有用性を示すために、脳の冠状縫合切断部での神経病理学的損傷に対するマクロライド化合物（I）の代表的な化合物の活性を以下に示す。

#### 方法

（1）研究は、スプラグ・ドーリー（Sprague-Dawley）雄性ラット（300-350 g；チャールスリバー社）を用いて行われた。動物は、FK506（10 mg/kg）、或いは賦形薬（トウイーン（Tween）-80を含有する50%エタノール生理食塩水溶液；最終的な容量は1 ml/kg）を腹腔内投与する前に、ペントバルビタール（サジッタール（Sagittal）；60 mg/kg i. p.）にて麻酔された。30分後、エンドセリン-1（3  $\mu$  l中に60 pmol）を、中大脳動脈に対し、約0.5 mm背側（ブレグマに対し、0.2 mm前側で、且つ5.2 mm外側；および硬膜に対し、7.5 mm下方）にある梨状皮質中に挿入した31ゲージのカニュレを通して、1分間かけて注入した。そのカニュレは、2-3分かけてゆっくりと引き抜かれる前に、更に5分間、その部位に放置され、それから頭皮が縫合された。ラットは直腸内に設置した温度計に付属の電気毛布（heating blanket）により、37-38℃に保たれた。手術の完了後、ラットを飼育ケージに戻す前に、麻酔から十分に回復するまで、37℃に保たれた恒温器に入れた。

注入をして3日後、ラットは、4%ホルムアルデヒドローリン酸緩衝食塩水を用いて経心臓的に固定化をする前に、メソヘキシトン（ブリータル（Brietal）；75 mg/kg i. p.）にて深く麻酔された。脳を無傷のまま切除し、それから冠状縫合切断面で、クリオスタットにより20  $\mu$  mに切断した。続いてその脳の切片を、クレシルバイオレットにより染色した。切片を光学顕微鏡により検査し、神経病理学的損傷の程度を、検査中処置群を知らされていない観察者により梗塞容量を算定して評価した。

ラットの中大脳動脈に対し、エンドセリン-1を血管周囲に微量適用すること

により生じる虚血性損傷の容量に対するFK506 (10 mg/kg) の効果：

	半球全体	線条体	新皮質
賦形薬 (n=7)	116±12	25±3	91±10
FK506 (n=8)	62±12**	24±2	38±11**

示されたデータは処置群につき、n匹の動物に対する平均の梗塞容量 (mm<sup>3</sup>) ±s.e.m.を意味する。

\*\*；多群間の比較には、ボンフェローニ統計 (Bonferroni Statistic) を用いたスチューデントt検定 (Student's t-test) により検定した。p ≤ 0.01の場合を有意差有りとした。

FK506は、皮質の梗塞容量を58%減少させたが、線条体の梗塞容量における効果は観察されなかった。半球全体の虚血性損傷の容量は、FK506で処置した群において47%減少した。

(2) 動物は(280-300 g、雄、スプラグ・ドーリー (Sprague-Dawley) ラット；チャールスリバー社、英国)、右大腿部の静脈中にカニユーレを挿入するために、一酸化二窒素と酸素中のハロタンの気体混合物(80:20 v/v中に1-2%)にて麻酔された。麻酔を続けながら、ラットを定位装置に置き、骨切除開頭術を行った。エンドセリン-1 (3 μl中に120 pmol)を、中大脳動脈に対し、約0.5 mm背側(ブレグマに対し、0.2 mm前側で、且つ5.2 mm外側；および硬膜に対し、7.5 mm下方)にある梨状皮質中に挿入

した29ゲージのカニユーレを通して、3分間かけて注入した。エンドセリン注入完了の1分後、ラットにFK506 (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg)、



或いは賦形薬（生理食塩水中の10%ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60（400mg/ml）/エタノール；1ml/kg）を静脈注射した。そのカニユーレは、ゆっくりと引き抜かれる前に、更に5分間、その部位に放置され、頭皮が縫合された。ラットは直腸の温度計に付属のサーモスタットで調節された電気毛布により37-38℃に保たれた。手術の完了後、麻酔から十分に回復するまで、体温が37℃に保たれるような恒温器にラットを入れた。注入をして3日後、ラットはパラホルムアルデヒド（リン酸緩衝食塩水中、4%）で経心臓的に固定化をする前に、ペントバルビタールにて深く麻酔された。脳を無傷のまま切除し、クリオスタットで20μmに分割し、クレシルバイオレットで組織学的に染色する前に、少なくとも24時間、10%のスクロースを含有する固定液に浸し、切片は処置群を知らされていない観察者により、光学顕微鏡下で検査された。梗塞の程度は、拡大図上で予め決められた8つのレベルで評価され、梗塞の容量はそれぞれの定位的な平面における損傷の断面面積と各平面間の距離を積算することにより計算される。皮質での虚血性脳損傷の容量は、ビヒクル対照と比較して62%（0.1mg/kg）、58%（0.3mg/kg）、65%（1.0mg/kg）減少した。

本発明を具体的に説明するために、以下に実施例を示す。

#### 実施例 1

FK506	1g
ヒドロキシプロピルメチルセルロース2910 (TC-5R)	1g
ラクトース	2g
クロスカルメロースナトリウム (Ac-Di-Sol)	1g

FK506（1g）をエタノール（10ml）に溶解し、この溶液にヒドロキシプロピルメチルセルロース2910 (TC-5R)（1g）を加えて、懸濁液を調製した。この懸濁液にジクロロメタン（5ml）を加えて、均一な溶液を調製した。ラクトース（2g）、およびクロスカルメロースナトリウム（商標名：Ac-D

i-Sol、旭化成工業社製）をこの溶液に均一に懸濁し、それから有機溶媒を蒸発させて除去した。残留生成物を真空乾燥器により減圧下で10時間乾燥し、

コーヒーミルにより2分間粉碎し、この後、ふるい(32号ふるい)にかけ、FK506の固体分散組成物(以下、SDFと称する)(5g)を得た。この組成物を通常の方法によりカプセルに充填して、1カプセルにつきFK506を1mg、または5mg含有するカプセル剤を得た。

#### 実施例2

FK506	10mg
HCO-60 (ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60)	400mg
エタノール	1mlまで

上述した成分を含有する溶液は、通常の方法により、エタノール中にFK506およびHCO-60を溶解することにより調製される。この溶液は、適当な容量の生理食塩水で希釈することで静脈注射により投与することができる。

#### 実施例3

FK506	2mg
ポリソルベート	50mg
プロピレングリコール	1mlまで

上記溶液は、実施例2と同様な方法で調製される。

本発明は、脳虚血性疾患、言い換えると、脳梗塞のような虚血により引き起こされる脳障害の予防または治療のための有用な医薬を提供するものである。つまり、以下に述べるような疾患、或いは損傷が起こった際に有用である。即ち、頭部損傷、くも膜下出血或いは脳内出血のような脳での出血、脳血栓症、脳塞栓症、心停止、脳卒中、一過性脳虚血発作(TIA)、高血圧性脳疾患などである。

## 国際様式 INTERNATIONAL FORM

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認)  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い  
発行される

原寄託についての受託証

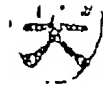
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNA-  
TIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT  
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES  
OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNA-  
TIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified  
at the bottom of this page.

寄託者 氏名(名称) 藤沢薬品工業株式会社  
あて名 代表取締役社長 藤澤友吉郎  
大阪市東区道修町4丁目3番地 股

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) ストレプトミセス・ツクバエンス No. 9993 ( <i>Streptomyces tsukubaensis</i> No. 9993)	(受託番号) 微工研条寄第 9 2 7 号 (FERM BP - 9 2 7 )
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、昭和 59 年 10 月 5 日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を 受託する。(昭和 59 年 10 月 5 日に寄託された微工研条寄第 7886 号より移管)	
IV. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所</p> <p>名称: Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大山次郎 Jiro Ooyama, Director General</p> <p>あて名: 日本国茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号(郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN</p>	
昭和 60 年 (1985) 10 月 19 日	



## 国際様式 INTERNATIONAL FORM

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認)  
に因するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNA-  
TIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT  
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES  
OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNA-  
TIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified  
at the bottom of this page.

寄託者 氏名(名称) 藤沢薬品工業株式会社  
あて名 代表取締役社長 藤澤友吉郎  
大阪市東区道修町4丁目3番地 殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した鑑別のための表示) ストレプトミセス ハイグロスコピカス サブスペシース ヤクシマエンシス No.7238 ( <i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>yakushimaensis</i> No.7238)	(受託番号) 微工研条寄第 928 号 (FERM BP - 928 )
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、昭和 60 年 1 月 12 日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を 受託する。(昭和 60 年 1 月 12 日に寄託された微工研条寄第 8043 号より移番)	
IV. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所</p> <p>名称: Fermentation Technology Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大山次郎 Jiro Ooyama, Director GENERAL.</p> <p>あて名: 日本国茨城県筑波郡谷田町東一丁目一丁目 郵便番号 305 ) 1-3, Higashi 1-chome Yatabe-machi Tsukuba-gun Ibaraki-ken 305, JAPAN</p>	
昭和 60 年 (1985) 10 月 19 日	

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP 93/01886

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 5 A61K31/445		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TRANSPLANTATION vol. 54, no. 4, 1992 pages 583 - 588 D.K. DHAR ET AL 'The salutary effect of FK506 in ischemia-reperfusion injury of the canine liver.' ---	
A	TRANSPLANTATION vol. 53, no. 5, 1992 pages 987 - 991 M. SAKR ET AL. 'The protective effect of FK506 pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury in rats' -----	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
18 March 1994		30. 03. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Klaver, T

---

フロントページの続き

(72)発明者 シャーキィ、ジョン  
イギリス国、イーエイチ8 9ジェイゼッ  
ド、エディンバラ、ジョージ スクウェア  
1、ユニヴァーシティ オブ エディン  
バラ内

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成11年(1999)10月12日

【公表番号】特表平8-505136

【公表日】平成8年(1996)6月4日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-515010

【国際特許分類第6版】

C07D 498/18

A61K 31/40 AAM

31/435 ABR

31/55 ABS

【F I】

C07D 498/18

A61K 31/40 AAM

31/435 ABR

31/55 ABS

手続補正書(自発)

平成11年 4月30日

特許庁長官 殿

1. 事件の要旨

平成6年特許願第515010号

2. 補正をする者

住所 大阪府大阪市中央区通修町3丁目4番7号

名称 株式会社高島工業株式会社

3. 代理人 0641 0046

住所 大阪府大阪市平野区三丁目3番9号(通不ビル)

高島国際特許事務所

電. (06)6227-1156

氏名 代理人(0079) 高島 一

4. 補正対象書類名

請求の範囲

5. 補正対象項目名

請求の範囲

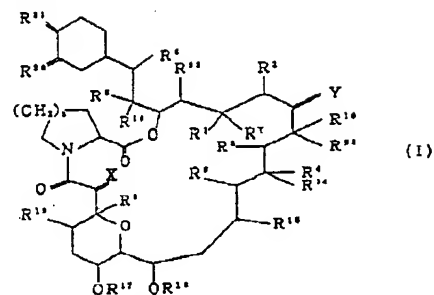
6. 補正の内容

別紙の通り

請求の範囲

別紙

1. 式(I):



$R^{1'}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{1''}$ 、 $R^{1''}$ および $R^{1''}$ は、独立して、H、またはアルキルを表し、

$R^{1'}$ と $R^{1''}$ は、独立して、Oを表すか、或いは、独立して( $R^{1'}$ a、H)および( $R^{1''}$ a、H)をそれぞれ示してもよく、 $R^{1'}$ aおよび $R^{1''}$ aは、独立して、OH、O-アルキル、またはOCH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>、OCH<sub>3</sub>を表すか、或いは $R^{1'}$ aは保護された水酸基であり、

加えて、 $R^{1'}$ aおよび $R^{1''}$ aは一組になって、エポキシ環の酸素原子を表してもよく、

nは1または2であり、

上記の定義に加えて、Y、 $R^{1'}$ および $R^{1''}$ は、それらが結合している炭素原子と共に、5又は6員のN、SまたはOを含む環系を表してもよく、この環は飽和でも不飽和でもよく、アルキル、水酸基、1つ又はそれ以上の水酸基で置換されたアルキル、O-アルキル、ベンジル、および(CH<sub>3</sub>、S<sub>6</sub>(C)、H)より選ばれる1つ又はそれ以上の基により置換されていてもよい。) )

で与えられるマクロライド化合物、またはその医薬上許容される塩を有効成分として含有する阻血剤性疾患の予防剤または治療剤。

2. マクロライド化合物が、17 アリル 1、14 ジヒドロキシ-12

(2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル)

-23、25-ジメトキシ-13、18、21、27-テトラメチル-11、2

8-ジオキサー-4-アザトリシクロ[2.2.3.1.0<sup>1,4</sup>.0<sup>2,5</sup>]オクタ-2ス-18

-コン-2、3、10、16-フラコンである請求の範囲第1項記載の予防剤

または治療剤。

3. 阻血剤性疾患が脈管系である請求の範囲第1項または第2項記載の予防剤または治療剤。

4. 阻血剤性疾患が脈管系により引き起こされる脳障害であり、その脳障害を予防または治療する為の、請求の範囲第1項または第2項記載の予防剤または治療剤。

5. 脳出血性疾患が、脳部損傷、くも膜下出血もしくは脳内出血のような脳の出血、脳血栓症、脳塞栓症、心停止、脳卒中、一過性脳虚血発作、または脳死

性疾患である、請求の範囲第1項または第2項記載の予防剤または治療剤。



# United States Patent [19]

Kelly et al.

[11] Patent Number: 5,648,351

[45] Date of Patent: Jul. 15, 1997

## [54] USE OF MACROLIDES FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHEMIA

[75] Inventors: John S. Kelly; Steven P. Butcher; John Sharkey, all of Edinburgh, United Kingdom

[73] Assignee: Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan

[21] Appl. No.: 464,815

[22] PCT Filed: Dec. 24, 1993

[86] PCT No.: PCT/JP93/01886

§ 371 Date: Jun. 29, 1995

§ 102(e) Date: Jun. 29, 1995

[87] PCT Pub. No.: WO94/14443

PCT Pub. Date: Jul. 7, 1994

## [30] Foreign Application Priority Data

Dec. 29, 1992 [GB] United Kingdom ..... 9227055

[51] Int. Cl.<sup>6</sup> ..... A61K 31/33

[52] U.S. Cl. .... 514/183

[58] Field of Search ..... 514/183

## [56] References Cited

### U.S. PATENT DOCUMENTS

5,266,594 11/1993 Dawson et al. .... 514/560

### FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0 184 162 6/1986 European Pat. Off. .  
2 248 184 4/1992 United Kingdom .  
WO89/05304 6/1989 WIPO .  
WO91/17754 11/1991 WIPO .

### OTHER PUBLICATIONS

Brian Research, vol. 595, No. 1, pp. 145-148, (1992), Y. Shiga, et al., "Cyclosporin a Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in the Brain".

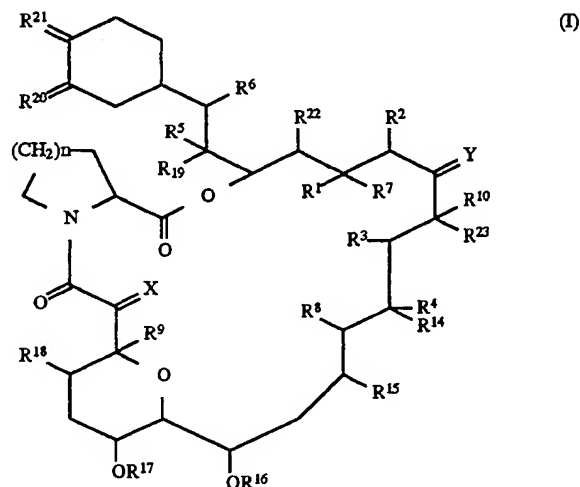
Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 90, pp. 9808-9812, Nov. (1993), T. Dawson, et al., "Immunosuppressant FK506 Enhances Phosphorylation of Nitric Oxide Synthase and Protects Against Glutamate Neurotoxicity".

The New York Times Science, May 25, (1993), G. Kolata, "Brain Researcher Makes It Look Easy", pp. B6-B7.

Primary Examiner—Raymond Henley, III  
Attorney, Agent, or Firm—Oblon, Spivak, McClelland, Maier & Neustadt, P.C.

## [57] ABSTRACT

The present invention relates to a new use of macrolide compounds of the formula (I):



wherein each symbol is as defined in the specification, for preventing or treating cerebral ischemic disease, such as, brain damage caused by ischemia, such as cerebral infarction. So, they are useful when the following diseases or injury occur. That is, head injury, hemorrhage in brain such as subarachnoid hemorrhage or intracerebral hemorrhage, cerebral thrombosis, cerebral embolism, cardiac arrest, stroke, transient ischemic attacks (TIA), hypertensive encephalopathy and so on.

4 Claims, No Drawings

# USE OF MACROLIDES FOR THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHEMIA

This application is a 371 of PCT/JP93/01886 filed Dec. 24, 1993.

## TECHNICAL FIELD

This invention relates to a new use of macrolide compounds.

In more detail, this invention relates to a new use of macrolide compounds for preventing or treating cerebral ischemic disease.

Accordingly, this invention provides a new use of the macrolide compounds for preventing or treating cerebral ischemic disease.

## BACKGROUND ART

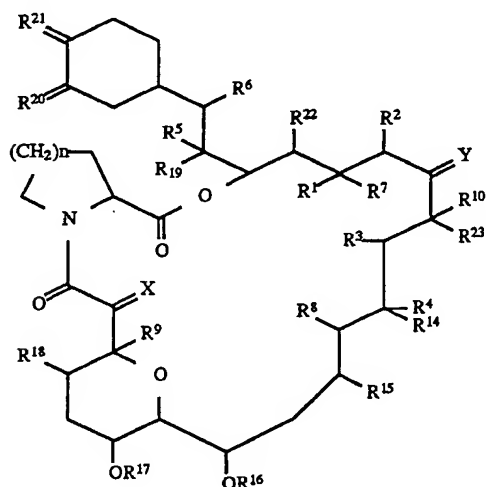
The macrolide compounds used in this invention are known and disclosed, for example, in European Patent Publication No. 0184162 and International Publication No. WO 89/05304.

These known macrolide compounds include the fermentation products, such as FR-900506, FR-900520, FR-900523 and FR-900525 which were isolated from microorganisms belonging to genus *Streptomyces*, such as *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 (FERM BP-927) or *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *yakushimaensis* No. 7238 (FERM BP-928), and their related compounds prepared from these fermentation products.

These macrolide compounds were indicated inter alia for use in the treatment of rejection to transplantation, autoimmune diseases and infectious diseases caused, for example, by *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichophyton*, and the like.

## DISCLOSURE INVENTION

The inventors of this invention have surprisingly found that the macrolide compounds mentioned hereinbelow have a neuroprotective activity, and that they are useful for preventing or treating cerebral ischemic disease, particularly cerebral infarction. The macrolide compounds used in this invention can be represented by the following general formula (I).



wherein

each vicinal pair of substituents [ $R^1$  and  $R^2$ ], [ $R^3$  and  $R^4$ ], [ $R^5$  and  $R^6$ ] independently

a) represent two vicinal hydrogen atoms, or

b) form a second bond between the vicinal carbon atoms to which they are attached;

in addition to its significance above,  $R^2$  may represent an alkyl group;

$R^7$  represents H, OH, protected hydroxy or O-alkyl, or in conjunction with  $R^1$  it may represent  $=O$ ;

$R^8$  and  $R^9$  independently represent H or OH;

$R^{10}$  represents H, alkyl, alkyl substituted by one or more hydroxyl groups, alkenyl, alkenyl substituted by one or more hydroxyl groups, or alkyl substituted by  $=O$ ;

X represents O (H, OH), (H, H) or  $-CH_2O-$ ;

Y represents O (H, OH), (H, H),  $N-NR^{11}R^{12}$  or  $N-OR^{13}$ ;

$R^{11}$  and  $R^{12}$  independently represent H, alkyl, aryl or tosyl;

$R^{13}$ ,  $R^{14}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{17}$ ,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{22}$  and  $R^{23}$  independently represent H or alkyl;

$R^{20}$  and  $R^{21}$  independently represent O, or they may independently represent ( $R^{20a}$ , H) and ( $R^{21a}$ , H) respectively;  $R^{20a}$  and  $R^{21a}$  independently represent OH, O-alkyl or  $OCH_2OCH_2OCH_2OCH_3$  or  $R^{21a}$  is protected hydroxy;

in addition,  $R^{20a}$  and  $R^{21a}$  may together represent an oxygen atom in an epoxide ring;

n is 1, 2 or 3;

in addition to their significances above, Y,  $R^{10}$  and  $R^{23}$ , together with the carbon atoms to which they are attached, may represent a 5- or 6- membered N-, S- or O- containing heterocyclic ring, which may be saturated or unsaturated, and which may be substituted by one or more groups selected from alkyl, hydroxy, alkyl substituted by one or more hydroxyl groups, O-alkyl, benzyl and  $-CH_2Se(C_6H_5)_2$ .

The specific examples of the definitions of compound (I) and the preferred working modes of the invention are described in detail below.

The term "lower" as used in this specification means, unless otherwise indicated, any number of carbon atoms between 1 and 6, inclusive.

Suitable "alkyl" means straight or branched saturated aliphatic hydrocarbon residue and may include lower alkyl such as methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, neopentyl, hexyl, and the like.

Suitable "alkenyl" means straight or branched unsaturated aliphatic hydrocarbon residue having one double bond and may include lower alkenyl such as vinyl, propenyl (e.g. allyl), butenyl, methylpropenyl, pentenyl, hexenyl, and the like.

Suitable "aryl" may include phenyl, tolyl, xylyl, cumenyl, mesityl, naphthyl, and the like.

Suitable examples of the protective group in the "protected hydroxyl group" may include:

1-(lower alkylthio)(lower)alkyl groups such as lower alkylthiomethyl groups (e.g. methylthiomethyl, ethylthiomethyl, propylthiomethyl, isopropylthiomethyl, butylthiomethyl, isobutylthiomethyl, hexylthiomethyl, etc.), more desirably  $C_1-C_4$  alkylthiomethyl groups, and most desirably methylthiomethyl; tri-substituted silyl groups such as tri(lower)alkylsilyl groups (e.g. trimethylsilyl, triethylsilyl, tributylsilyl, tert-butyl-dimethylsilyl, tri-tert-butylsilyl, etc.), lower alkyl-diarylsilyl groups (e.g. methyldiphenylsilyl, ethyldiphenylsilyl, propyldiphenylsilyl, tert-butyl-diphenylsilyl, etc.), more desirably tri( $C_1-C_4$ )alkylsilyl and  $C_1-C_4$  alkyl-diphe-

nylsilyl groups and most desirably tert-butyl dimethylsilyl and tert-butyl diphenylsilyl; and acyl groups such as aliphatic acyl groups, aromatic acyl groups and aliphatic acyl groups substituted by aromatic groups, which are derived from carboxylic acids, sulfonic acids or carbamic acids.

The aliphatic acyl group may include lower alkanoyl groups which may optionally have one or more suitable substituents such as carboxy (e.g. formyl, acetyl, propionyl, butyryl, isobutyryl, valeryl, isovaleryl, pivaloyl, hexanoyl, carboxyacetyl, carboxypropionyl, carboxybutyryl, carboxyhexanoyl, etc.), cyclo(lower)alkoxy(lower)alkanoyl groups which may optionally have one or more appropriate substituents such as lower alkyl (e.g. cyclopropyloxyacetyl, cyclobutyloxypropionyl, cycloheptyloxybutyryl, menthyloxyacetyl, menthyloxypropionyl, menthyloxybutyryl, menthyloxy-pentanoyl, menthyloxyhexanoyl, etc.), camphorsulfonyl, lower alkyl-carbamoyl groups having one or more suitable substituents such as carboxy or protected carboxy, for example carboxy (lower)alkylcarbamoyl groups (e.g. carboxymethylcarbamoyl, carboxyethylcarbamoyl, carboxypropylcarbamoyl, carboxybutylcarbamoyl, carboxypentylcarbamoyl, carboxyhexylcarbamoyl, etc.), protected carboxy(lower)alkylcarbamoyl groups such as tri (lower)alkylsilyl(lower)alkoxycarbonyl(lower)alkylcarbamoyl groups (e.g. trimethylsilyl-methoxycarbonylethylcarbamoyl, trimethylsilylethoxycarbonylpropylcarbamoyl, triethylsilylethoxycarbonylpropylcarbamoyl, tert-butyl dimethylsilylethoxycarbonylpropylcarbamoyl, trimethylsilylpropoxycarbonylbutylcarbamoyl, etc.), and so on.

The aromatic acyl group may include aroyl groups which may optionally have one or more suitable substituents such as nitro (e.g. benzoyl, toluoyl, xyloyl, naphthoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, nitronaphthoyl, etc.), arene-sulfonyl groups which may optionally have one or more suitable substituent(s) such as halogen (e.g. benzenesulfonyl, toluenesulfonyl, xylenesulfonyl, naphthalenesulfonyl, fluorobenzenesulfonyl, chlorobenzenesulfonyl, bromobenzenesulfonyl, iodobenzenesulfonyl, etc.), and so on.

The aromatic group-substituted aliphatic acyl group may include ar(lower)alkanoyl groups which may optionally have one or more suitable substituent(s) such as lower alkoxy and trihalo(lower)alkyl (e.g. phenylacetyl, phenylpropionyl, phenylbutyryl, 2-trifluoromethyl-2-methoxy-2-phenylacetyl, 2-ethoxy-2-trifluoromethyl-2-phenylacetyl, 2-trifluoromethyl-2-propoxy-2-phenylacetyl, etc.), and so on.

Among the above-mentioned acyl groups, the more desirable acyl groups are C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkanoyl groups which may optionally be substituted by carboxy, cyclo(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)alkyloxy (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkanoyl groups having two (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl groups in the cycloalkyl moiety, camphorsulfonyl, carboxy(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkylcarbamoyl groups, tri(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkylsilyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkoxycarbonyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkylcarbamoyl groups, benzoyl which may have one or two nitro groups, halogen-substituted benzenesulfonyl groups, phenyl(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkanoyl groups having C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>alkoxy and trihalo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkyl groups. Of these groups, the most desirable are acetyl, carboxypropionyl, menthyloxyacetyl, camphorsulfonyl, benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, iodobenzenesulfonyl and 2-trifluoromethyl-2-methoxy-2-phenylacetyl.

Suitable "5- or 6-membered N-, S- or O-containing heterocyclic ring" may include pyrrolyl, tetrahydrofuryl, and the like.

Preferred embodiments of the Symbols R<sup>1</sup> to R<sup>10</sup>, R<sup>14</sup> to R<sup>23</sup>, X, Y and n are as follows.

R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are each hydrogen or combined to form a second bond;

R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> are combined to form a second bond;

R<sup>5</sup> and R<sup>6</sup> are combined to form a second bond;

R<sup>7</sup> is hydrogen, hydroxy, O-lower alkyl such as methoxy or protected hydroxy;

R<sup>8</sup> is hydrogen or hydroxy;

R<sup>9</sup> is hydroxy;

R<sup>10</sup> is methyl, ethyl, propyl, allyl or 2-oxopropyl;

R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, R<sup>18</sup>, R<sup>19</sup> and R<sup>22</sup> are each methyl;

R<sup>20</sup> is oxo or (R<sup>20a</sup>, H), wherein R<sup>20a</sup> is hydroxy or methoxy;

R<sup>21</sup> is (R<sup>21a</sup>, H), wherein R<sup>21a</sup> is hydroxy or protected hydroxy;

R<sup>23</sup> is hydrogen;

X is oxo, (H, OH) or (H, H);

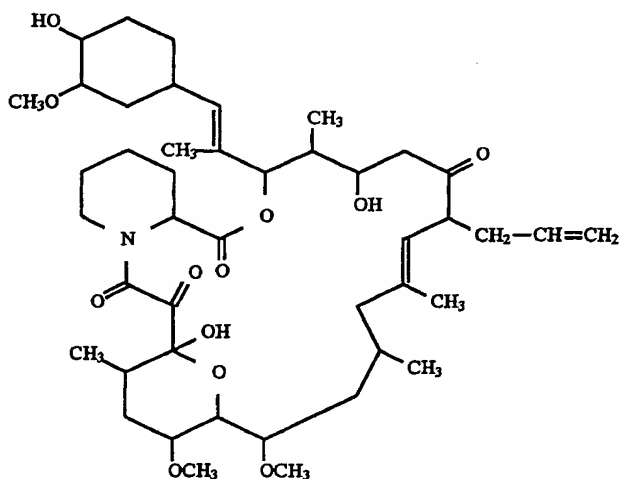
Y is oxo; and

n is 1 or 2.

The pharmaceutically acceptable salt of the compound (I) is a nontoxic salt, which may be the corresponding salt with an inorganic or organic base such as alkali metal salts (e.g. sodium salt, potassium salt, etc.), alkaline earth metal salts (e.g. calcium salt, magnesium salt, etc.), ammonium salt and amine salts (e.g. triethylamine salt, N-benzyl-N-methylamine salt, etc.), and so on.

Regarding the macrolide compounds (I), there may exist one or more conformers, or one or more stereoisomeric pairs such as optical and geometrical isomers due to the asymmetric carbon(s) or the double bond(s). Such conformers and isomers also fall within the scope of the invention.

Particularly, the most interesting compound is FR-900506 of the following formula.



(hereinafter, described as FK506)

Chemical name: 17-allyl-1,14-dihydroxy-12-[2-(4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl)-1-methylvinyl]-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxo-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone.

Other preferable compounds are listed hereinbelow.

1,14-dihydroxy-12-[2-(4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl)-1-methylvinyl]-23,25-dimethoxy-13,19,17,21,27-pentamethyl-11,28-dioxo-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone,

12-[2-(4-acetoxy-3-methoxycyclohexyl)-1-methylvinyl]-17-allyl-1,14-dihydroxy-23,25-dimethoxy-13,19,21,

- 27-tetramethyl-11,28-dioxa-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>] octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone,  
 17-allyl-1,14-dihydroxy-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-12-[2-[4-(3,5-dinitrobenzoyloxy)-3-methoxycyclohexyl]-1-methylvinyl]-11,28-dioxa-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>] octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone,  
 17-allyl-12-[2-[4-((-)-2-trifluoromethyl-2-methoxy-2-phenylacetoxy)-3-methoxycyclohexyl]-1-methylvinyl]-1,14-dihydroxy-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxa-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>] octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone,  
 17-ethyl-1,14-dihydroxy-12-[2-(4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl)-1-methylvinyl]-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxa-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>] octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone, and  
 17-ethyl-1,14,20-trihydroxy-12-[2-(3,4-dihydroxycyclohexyl)-1-methylvinyl]-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxa-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>] octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone.

The macrolide compounds (I) of the present invention can be administered in a pure or impure form and in a single compound or a mixture thereof, preferably, in a pharmaceutical vehicle or carrier.

The pharmaceutical composition of this invention can be used in the form of a pharmaceutical preparation, for example, in solid, semisolid or liquid form, which contains the macrolide compounds of the present invention, as an active ingredient, in admixture with an organic or inorganic carrier or excipient suitable for external (topical), enteral, oral, intravenous, intramuscular, or parenteral applications. The active ingredient may be compounded, for example, with the usual non-toxic, pharmaceutically acceptable carriers for ointment, cream, plaster, tablets, pellets, capsules, suppositories, solutions (saline, for example), emulsion, suspensions (olive oil, for example), and any other form suitable for use. The carriers which can be used are water, wax, glucose, lactose, gum acacia, gelatin, mannitol, starch paste, magnesium trisilicate, talc, corn starch, keratin, paraffin, colloidal silica, potato starch, urea and other carriers suitable for use in manufacturing preparations, in solid, semisolid, or liquid form, and in addition auxiliary, stabilizing, thickening and coloring agents and perfumes may be used. The active compound is included in the pharmaceutical composition in an effective amount sufficient to produce the desired effect upon the process or condition of the diseases.

Mammals which may be treated by the present invention include livestock mammals such as cows, horses, etc., domestic animals such as dogs, cats, rats, etc. and humans, preferably humans.

For applying this composition to a human, it is preferable to apply it by oral, parenteral, enteral, intravenous, or intramuscular administration.

While the dosage of therapeutically effective amount of the macrolide compounds varies from and also depends upon the age and condition of each individual patient to be treated, in case of the systemic administration, a daily dose of about 0.0001–1000 mg, preferably 0.001–500 mg and more preferably 0.01–100 mg of the active ingredient is generally given for treating the diseases, and an average single dose of about 0.001–0.01 mg, 0.2–0.5 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg and 500 mg is generally administered. Daily doses for chronic administration in humans will be in the range of about 0.05–50 mg/kg/day, preferably 0.1–10 mg/kg/day, and more preferably 0.1–0.3 mg/kg/day.

And further, it is considered that the compounds disclosed in the following patent applications such as EP-A-353678,

Japanese Patent Application No. 2(1990)-74330, PCT/GB90/01262, EP-A-4135532, PCT/IP91/00314, British Patent Applications No. 9012963.6, No. 9014136.7, No. 9014681.2, No. 9014880.0, No. 9014881.8, No. 9015098.8, No. 9016115.9, and No. 9016693.5, EP-A-323865, EP-A-349061, EP-A-358508, EP-A-364031, EP-A-364032, EP-A-378317, EP-A-378320, EP-A-378321, EP-A-388153, EP-A-396399, EP-A-396400, EP-A-399579, EP-A-403242, EP-A-428365, EP-A-356399, GB 2225576 A, EP-A-402931, EP-A-427680, EP-A-445975, EP-A-455427, EP-A-463690, EP-A-464895, EP-A-466365, EP-A-478235, OEP-A-480623, EP-A-509753, EP-A-515071, EP-A-520554, EP-A-526934, EP-A-530888, EP-A-532089, and EP-A-532088, WO92/06992, WO92/20688, WO93/04679, WO93/05059, and WO93/04680, U.S. Pat. No. 5149701, German Patent Applications A-4021404, A-4028664, A-4028665, A-4028666, A-4028667, A-4028675, A-4028676, A-4028677, A-4028678, and A-4039587; and so on, are also useful for the diseases shown in the present specification.

In order to exhibit the usefulness of the present invention, the activity of the representative compound of the macrolide compounds (I) against neuropathological damage on coronal sections of brain is shown below.

#### METHODS

(1) Studies were performed on male Sprague-Dawley rats (300–350 g; Charles River). Animals were anaesthetised with pentobarbitone (Sagittal; 60 mg/kg; i.p.) prior to the administration of FK506 (10 mg/kg) or vehicle (50% ethanol in physiological saline containing Tween-80; final volume of 1 ml/kg) by the intraperitoneal route. Thirty minutes later, endothelin-1 (60 pmol in 3  $\mu$ l) was injected over 1 minute via a 31-gauge cannula stereotactically placed into the piriform cortex approximately 0.5 mm dorsal to the middle cerebral artery (0.2 mm anterior and 5.2 mm lateral to bregma; and 7.5 mm below the dura). The cannula was left in situ for a further 5 minutes before being slowly withdrawn over 2–3 minutes, and the scalp was then sutured. Rats were maintained at 37°–38° C. throughout the procedure by means of a heating blanket attached to thermometer placed in the animal's rectum. Upon completion of surgery, the animals were placed in an incubation chamber maintained at 37° C. until they had fully recovered from the anaesthetic before being returned to their home cage.

Three days after injection, the rats were deeply anaesthetised with methohexitone (Brietal; 75 mg/kg; i.p.) prior to transcardiac fixation with 4% formaldehyde in phosphate buffered saline. The brains were removed intact, then cryostat sectioned (20  $\mu$ m) in the coronal plane. Brain sections were subsequently stained by cresyl violet. Sections were examined by light microscopy, and neuropathological damage was estimated by assessment of infarct volume by an observer who was unaware of the treatment group under examination.

Effect of FK506 (10 mg/kg) upon the volume of ischemic damage produced by the perivascular microapplication of endothelin-1 onto the rat middle cerebral artery:

	Total Hemisphere	Striatum	Neocortex
Vehicle (n = 7)	116 $\pm$ 12	25 $\pm$ 3	91 $\pm$ 10
FK506 (n = 8)	62 $\pm$ 12**	24 $\pm$ 2	38 $\pm$ 11**

Data presented are mean infarct volume (mm<sup>3</sup>)  $\pm$  s.e.m. for n animals per treatment group.

\*\*; p  $\leq$  0.01 Student's t-test with Bonferroni statistic for multiple comparisons.

FK506 reduced the cortical infarct volume by 58% whereas no effect on striatal infarct volume was observed. The total hemispheric volume of ischemic damage was reduced by 47% in the FK506 treated group.

(2) Animals (280–300 g, male, Sprague-Dawley; Charles River, U.K.) were anaesthetized with a gaseous mixture of halothane in nitrous oxide and oxygen (1–2% in 80:20 v/v) in order to insert cannulae into the right femoral vein. With anaesthesia continuing, the rats were placed in a stereotaxic frame, a craniectomy performed and endothelin-1 (120 pmol in 3  $\mu$ l) was injected over 3 minutes via a 29-gauge cannula stereotaxically placed into the piriform cortex approximately 0.5 mm dorsal to the middle cerebral artery (0.2 mm anterior and 5.2 mm lateral to bregma; and 7.5 mm below the dura). Rats received an intravenous injection of FK506 (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg) or intravenous vehicle (10% polyoxyethylenehydrogenated castor oil 60 (400 mg/ml)/ ethanol in physiological saline; 1 ml/kg) one minute after the completion of the endothelin injection. The cannula was left in situ for a further 5 minutes before being slowly withdrawn, and the scalp sutured closed. Rats were maintained at 37°–38° C. throughout the procedure using a thermostatically-controlled heating blanket attached to a rectal thermometer. Upon completion of surgery, animals were placed in an incubator in which body temperature was maintained at 37° C. until they had fully recovered from the anaesthetic. Three days after injection, the rats were deeply anaesthetized with pentobarbitone prior to transcardiac fixation with paraformaldehyde (4% in phosphate buffered saline). The brain was then removed intact and immersed in fixative containing 10% sucrose for at least 24 hrs prior to cryostat sectioning at 20  $\mu$ m and histological staining with cresyl violet. Sections were examined under light microscopy by an individual who was unaware of the treatment group. The extent of the infarction, at 8 predetermined levels was annotated onto enlarged diagrams and the volume of infarction calculated by integrating the cross-sectional area of damage at each stereotaxic level and the distances between the various levels. The volume of ischemic brain damage in the cortex was reduced by 62% (0.1 mg/kg), 58% (0.3 mg/kg) and 65% (1.0 mg/kg) when compared with vehicle controls.

The following examples are given for the purpose of illustrating the present invention.

#### EXAMPLE 1

FK506	1 g
Hydroxypropyl methylcellulose 2910 (TC-5R)	1 g
Lactose	2 g
Croscarmellose sodium (Ac-Di-Sol)	1 g

FK506 (1 g) was dissolved in ethanol (10 ml), and thereto was added hydroxypropyl methylcellulose 2910 (TC-5R) (1 g) to prepare a suspension. To this suspension was added dichloromethane (5 ml) to prepare a homogeneous solution. Lactose (2 g) and croscarmellose sodium (Trade Mark: Ac-Di-Sol, maker: Asahi Chemical Industry) were homogeneously suspended to this solution, and then the organic solvent was removed by evaporation. The residual product was dried under reduced pressure for 10 hours by vacuum dryer, milled for 2 minutes by coffee mill and then passed through a sieve (32 mesh) to give the solid dispersion composition of FK506 (5 g) (hereinafter, described as SDF). This composition was capsulated by a conventional manner to provide capsules containing 1 mg or 5 mg of FK506 per each capsule.

#### EXAMPLE 2

FK506	10 mg
HCO-60 (polyoxyethylenehydrogenated castor oil 60)	400 mg
Ethanol	to 1 ml

The solution comprising the ingredients stated above is prepared by dissolving the FK506 and HCO-60 in ethanol by a conventional manner. It can be administered via i.v. infusion by diluting with a proper volume of physiological saline.

#### EXAMPLE 3

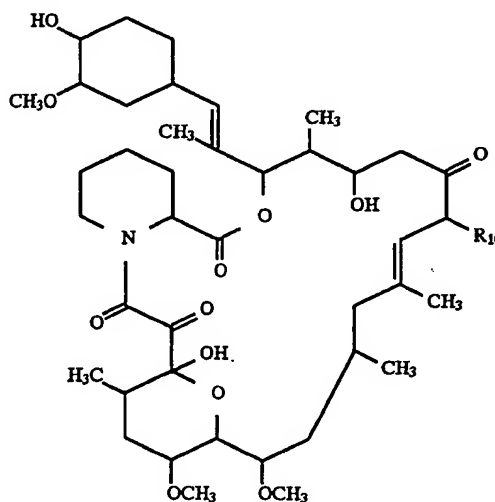
FK506	2 mg
Polysorbate	50 mg
Propylene glycol	to 1 ml

The above solution is prepared in a similar manner of the Example 2.

The present invention provides useful drugs for preventing or treating cerebral ischemic disease, in other word, brain damage caused by ischemia, such as cerebral infarction. So, they are useful when the following diseases or injury occur. That is, head injury, hemorrhage in brain such as subarachnoid hemorrhage or intracerebral hemorrhage, cerebral thrombosis, cerebral embolism, cardiac arrest, stroke, transient ischemic attacks (TIA), hypertensive encephalopathy and so on.

We claim:

1. A method for preventing or treating cerebral ischemic disease, comprising administering to a patient in need thereof, a macrolide compound of the formula:



wherein R<sup>10</sup> is methyl, ethyl, propyl or allyl, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. The method of claim 1, wherein said macrolide compound is 17-allyl-1,14-dihydroxy-12-[2-(4-hydroxy-3-methoxycyclohexyl)-1-methylvinyl]-23,25-dimethoxy-13,19,21,27-tetramethyl-11,28-dioxo-4-azatricyclo[22.3.1.0<sup>4,9</sup>]octacos-18-ene-2,3,10,16-tetraone.

3. The method of claim 1, wherein said cerebral ischemic disease is cerebral infarction.

4. The method of claim 1, wherein said method is for treating cerebral ischemic disease.